



Centre  
de coopération  
internationale  
en recherche  
agronomique  
pour le  
développement

Département  
des cultures  
pérennes  
CIRAD-CP

**COMPTE RENDU  
ACIAR COCONUT MEETING**

**TAVEUNI (FIJI) 10-12 NOVEMBRE 1993**

Michel DOLLET

N° CP 149/94

12, square  
Pétrarque  
75116 Paris  
France  
téléphone :  
(1) 45 53 60 25  
télécopie :  
(1) 45 53 68 11  
télex :  
645491 F

EPIC-SIRET  
331 596 270 00024

**COMPTE-RENDU  
ACIAR COCONUT MEETING  
TAVEUNI (FIJI) 10-12 NOVEMBRE 1993**

M. DOLLET

**INTRODUCTION**

Cet atelier de travail sur la recherche cocotier dans le Pacifique correspondait à la fin d'une revue externe des programmes en cours financés par l'ACIAR.

Notre participation à cet atelier a été proposée lors de la réunion COGENT (Réseau des Ressources génétiques Cocotier) qui s'est tenue à Montpellier en Septembre 93 à la suite du séminaire EUROCOCO. L'objectif était d'apporter des critiques positives, basées sur des argumentations et expérimentations scientifiques, sur les récentes déclarations faites par l'équipe de virologie du Waite Agricultural Research Institute à Adélaïde. En effet, cette équipe avait demandé dans deux publications d'audience internationale ("Plant Disease" et "Annals of Applied Biology") un embargo total sur l'échange de germplasma cocotier en raison de l'existence de "séquences apparentées au viroïde du Cadang-Cadang du cocotier" identifiées dans de nombreux pays d'Asie et du Pacifique, dans des cocotiers apparemment sains. Ces déclarations ont évidemment profondément traumatisé certains pays producteurs de cocotiers et arrêté net des programmes d'introduction de nouvelles variétés.

**I - PRESENTATIONS PAR PAYS**

Les délégués de différents pays du Pacifique ont présenté l'état de la culture du cocotier dans leurs pays (Fiji, Papouasie Nouvelle Guinée, Iles Solomon, Tonga, Vanuatu).

Dans toutes les communications on retrouve les mêmes préoccupations :

- 1) Les cocotiers locaux deviennent de plus en plus séniles et moins producteurs (une bonne partie de la cocoteraie a souvent plus de 60 ans).
- 2) Or, le cocotier représente souvent une des principales ressources du pays (entre la 1ère et la 5ème).
- 3) Il n'y a pas de facteur limitant majeur pour cette culture au niveau phytosanitaire. Il existe bien quelques dégâts d'insectes (*Oryctes*, *Brontispa*) mais l'issue n'est pas -ou rarement- fatale, et l'on peut lutter contre ces ravageurs si l'on s'en donne les moyens (lutte biologique contre *Oryctes* avec *Baculovirus* à Fiji par exemple).
- 4) Enfin, tous les pays souhaiteraient replanter avec des variétés ou des hybrides plus performants. (Donc introduire des semences ou du pollen d'autres régions).

## **II - RECHERCHES SUR L'AMELIORATION VARIETALE DU COCOTIER**

. Des prospections australiennes ont été réalisées dans tout le pacifique jusqu'en Polynésie. La culture d'embryons a été mise au point de manière à réaliser les futurs échanges sous cette forme (en tube de culture *in vitro*) plutôt que par la noix, éliminant ainsi certains risques (acariens, insectes, champignons).

. Roger ASHBURNER a présenté les travaux concernant les marqueurs génétiques du cocotier. Les deux axes d'études en cours sont : les RFLP et les RAPD.

Les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) donnent des paramètres de mesure du génome entier de l'organisme, paramètres qui ne dépendent pas des facteurs environnementaux.

Les RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) sont basés sur une technique d'amplification d'une portion de génome par une enzyme particulière (la Taq Polymérase, à l'origine de la Polymérase Chain Reaction ou PCR). Ils permettent de mettre en évidence des séquences (morceaux de génomes) caractéristiques de l'espèce ou de la variété. Ces tests ne demandent que peu de matériel (1 cm de feuille) et sont relativement rapides.

Les premiers résultats obtenus montrent que tous les cocotiers du Sud Pacifique sont très proches sinon identiques exceptés le Grand de Rennell, le Grand des Marquises et le Niu Leka. Ils sont tous très différents du cocotier du Sud de l'Indonésie (Cocos Keeling Islands). Le Grand de Tahiti est par contre très variable.

Il faudra maintenant essayer de corréliser ces marqueurs à des données telles que la production, le rendement en huile, la tolérance à une maladie donnée, la tolérance à la sécheresse ou l'adaptation aux différents types de sols, etc...

## **III - RECHERCHES SUR LES MALADIES A VIRUS ET A VIROIDES**

### **III. a Cadang-Cadang**

. Richard HODGSON (W.A.R.I. Adélaïde) a présenté les possibilités d'utilisation de la biologie moléculaire (sondes, hybridations, PCR pour l'étude des virus ou viroïdes). (Annexe I).

. John RANGLES a axé son exposé sur deux concepts : les séquences apparentées au Coconut Cadang-Cadang Viroid (CCVd) et les mutations du CCCVd.

### **Séquences apparentées au CCCVd**

Sur les 26 pays visités par J. RANGLES pour prise d'échantillons, il n'y en a qu'un dont les tests d'hybridation sont restés négatifs avec la sonde CCCVd (mais il n'y a eu que deux échantillons testés) (Annexe II). Le pourcentage d'arbres positifs -dans des pays ou zones où la maladie du Cadang-Cadang n'a jamais été reportée- varie de 17 à 100 % ! Le seul argument justifiant a posteriori ces chiffres, réside dans l'aspect "chétif" de beaucoup

d'arbres du Pacifique, avec des jaunissements, des "pencils points" et des faibles productions. Argument qu'il a été relativement aisé d'éliminer puisque l'on sait que la majorité des cocotiers des îles du Pacifique ont plus de 50 ans, que seule une minorité a reçu quelques apports d'engrais, et enfin que ces arbres âgés, hauts de 15 mètres ou plus ne sont pas traités quand ils subissent une attaque de *Brontispa* ou autre ravageur. Nous avons également pu évoquer -cela n'avait pas été présenté par J. RANGLES- les travaux faits au Vanuatu par ce dernier avec l'aide de J. P. MORIN. J. RANGLES n'a trouvé au Vanuatu aucune corrélation entre les différences de rendements des cocotiers de Saraoutou, leur vigueur et la présence ou l'absence de molécules apparentées au CCCVd !

### **Mutations**

L'autre cheval de bataille de J. RANGLES repose maintenant sur les possibilités de mutations de ces séquences apparentées. Il se base pour cela sur des recherches effectuées aux Philippines (Annexe II). Dans ce pays, un symptôme sévère de Cadang-Cadang a été observé sur des cocotiers inoculés mécaniquement avec du CCCVd purifié pour tester leur tolérance à la maladie. Cet isolat de CCCVd, réextrait, a été séquencé. Il s'avère que le viroïde a subi plusieurs mutations ponctuelles. Les conclusions tirées par J. RANGLES, consistent à dire qu'"il existe donc des possibilités de mutations qui pourraient aggraver le problème Cadang-Cadang". Seulement, J. RANGLES omet de préciser qu'il s'agit là de conditions tout à fait artificielles : extraction chimique et biochimique des molécules de CCCVd, purification par des méthodes biophysiques, par isolements répétés sur gel d'électrophorèse, et enfin inoculation sous pression (le tir à l'aide d'un "dermojet", atteint la vitesse du son) dans de très jeunes plantules, voir sur le germe).

Pour que la même chose se produise naturellement, il faudrait :

- 1°) que ces "related sequences" soient vraiment des molécules de structure viroïdale. (cela n'a pas été montré. N'importe quelle séquence d'un ARN ou ADN a une certaine probabilité statistique de s'hybrider ou pas sur une certaine longueur de la sonde CCCVd),
- 2°) que des mutations se produisent,
- 3°) que ces mutations soient aggravantes. (On connaît des mutations du Potato Spindle Tuber Viroid qui donnent des souches douces n'induisant pratiquement aucun symptôme),
- 4°) que la multiplication de ces molécules mutées excède celle des molécules non mutées,
- 5°) que ces molécules mutées dans un arbre donné soient transmises à un autre (ou d'autres) arbre(s) pour créer une épidémie. Donc que les facteurs de transmission (vecteurs ?) existent dans le pays considéré.

Nous avons mis l'accent sur ces faits et la majorité des gens a convenu qu'il y avait là beaucoup de spéculations et que nous étions plus dans le domaine de la science fiction que dans la programmation d'une recherche appliquée au développement.

### **III.b Molécules de type viroïde chez le palmier à huile**

Nous avons pour notre part présenté nos résultats sur l'isolement de "molécules de type viroïdes" à partir de palmiers à huile malades ou sains d'Amérique du Sud aussi bien que d'Afrique, et fait état des conclusions auxquelles nous étions arrivés : ces molécules ne sont reliées à aucun syndrome pathologique d'une part, d'autre part, les caractéristiques biophysiques (électrophorèse en thermogradient) et sérologiques (utilisation d'anticorps monoclonaux anti ds RNA) de ces molécules ont montré qu'il s'agissait sans doute de molécules d'ARN double brin et non de viroïdes. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces mêmes ARN double brin pourraient exister chez le cocotier.

Suite à notre présentation, certaines personnes (M. DIECKMANN, F. ROGNON) ont proposé que l'équipe d'Adélaïde -ou une autre- puisse vérifier par les techniques que nous avons utilisées, que les "séquences apparentées au CCCVd" étaient bien des structures de type viroïde et non des ds RNA. Mais les chercheurs d'Adélaïde semblent plutôt s'orienter vers une recherche destinée à mettre au point une sonde et une méthodologie d'hybridation plus spécifique.

### **III. c Coconut Foliar Decay Virus (CFDV)**

J. RANGLES a présenté l'avancement des travaux sur le CFDV. Il s'agissait principalement de la mise au point du diagnostic du CFDV à l'aide d'une sonde moléculaire, radioactive ou froide. La sensibilité des tests de diagnostic semble s'améliorer mais il reste encore des résultats inexplicables. Par contre, l'utilisation des anticorps monoclonaux reste toujours improductive.

\*  
\*       \*

A signaler, concernant ces problèmes de défense des cultures et de quarantaine, qu'une réunion des responsables de la protection des végétaux de tout le Pacifique se tiendra à Nouméa en février 94. Cadang-Cadang, molécules apparentées et CFDV seront à l'ordre du jour.

## **IV - DISCUSSIONS RECOMMANDATIONS**

Près d'une demi journée a été consacrée à essayer de tirer des conclusions et des recommandations quant au problème des molécules à séquence apparentée au CCCVd. L'implication directe étant le problème des échanges de germplasma : doit-on ou pas "indexer" pour la présence de séquences apparentées au CCCVd.



. On peut dire que beaucoup de participants ont compris que J. RANGLES les entraînait actuellement dans un domaine de science fiction. On peut citer différentes remarques faites lors de cette discussion :

- M. FOALE (Australie) : On ne peut pas accepter que l'on dise que de vieux cocotiers puissent être affectés par des viroïdes parcequ'ils ont un mauvais aspect ; ils peuvent avoir des carences, des dégâts d'insectes...

- R. ASHBURNER (Australie) : Les échanges de germplasma dans le Pacifique ne datent pas d'hier. Ils ont été nombreux et le Cadang-Cadang (la maladie) est toujours restée localisée aux Philippines et à Guam.

- H. HARRIS (Angleterre) : Il est important d'importer.

- C. PIGGIN (Plant Projects Coordinator ACIAR) : Est-il réaliste d'imposer un contrôle ? Il faut trouver une recommandation pratique. Tant que l'on n'a pas prouvé que ces séquences apparentées sont pathogènes, chaque pays doit décider seul s'il doit ou ne doit pas importer.

- VILSONI (FIJI) : Si le risque de mutation existe, pourquoi ne s'est-il encore jamais produit (excepté aux Philippines en conditions artificielles).

Etc, etc....

Le doute s'est donc vraiment installé dans les esprits. Tout le monde a compris que tant que l'on avait pas prouvé la pathogénicité de ces molécules apparentées, il était exagéré de faire de l'indexage sur ces molécules. D'ailleurs, l'exemple fourni par Roger ASHBURNER montre les limites de cette procédure : 95 % de ces cultures d'embryons prélevés lors d'une prospection dans le pacifique (prélèvement sur arbres sains bien portants évidemment) se sont révélés "positifs" pour la présence de ces séquences apparentées et la Papouasie Nouvelle Guinée a donc refusé cette introduction en accord avec ces futures guidelines FAO IBPGR. Or la PNG fait partie des pays échantillonnés par J. RANGLES, pays où ont été trouvées ces séquences ! On comprendra donc l'ambiguïté de la situation. La PNG devrait savoir qu'elle est certainement dans la liste des pays positifs !

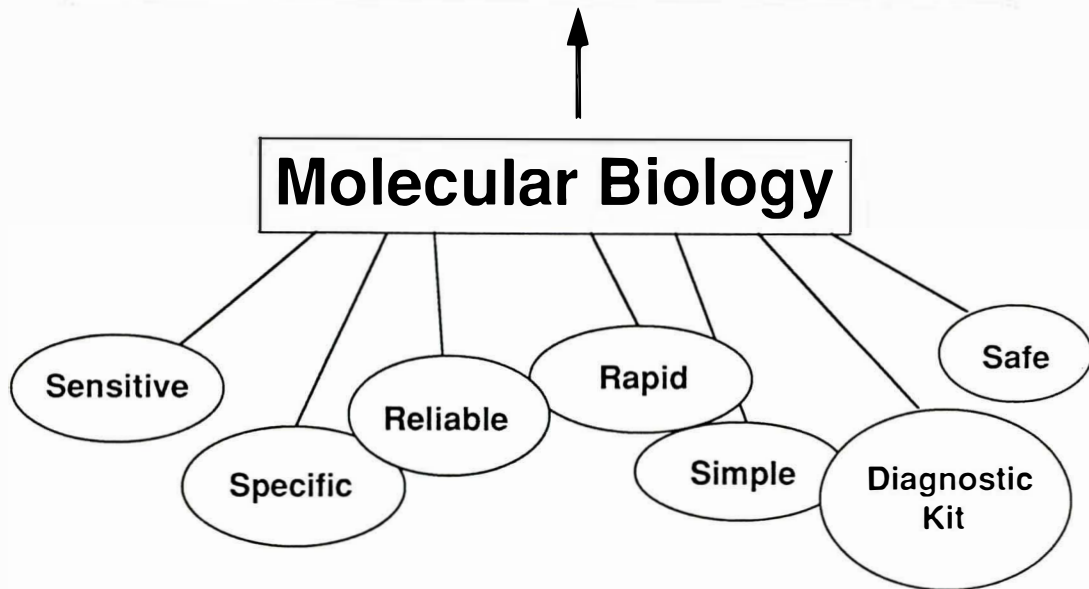
A l'issue de ces discussions, nous avons été chargés -J. RANGLES, M. HAZELMAN, M. DOLLET- de rédiger un "communiqué-consensus". Après discussion serrées, nous n'avons pu aboutir qu'à un très court texte exprimant : la nécessité des échanges de germplasma ; le besoin de prouver la pathogénicité des séquences apparentées au CCCVd ; démontrer leur nature viroïde ; le souhait des Pays du Pacifique à se référer aux recommandations FAO-IBPGR (Guidelines) pour tout ce qui concerne les échanges de semences ; le souhait de voir les moyens nécessaires mis en œuvre pour les indexages de germplasma.

Le texte de ce communiqué a été longuement rediscuté en séance plénière le vendredi 12 après-midi, après notre départ. Le texte définitif est donné en annexe III.

# **ANNEXES**

# Improvement of Coconut Production

## Detection of Cadang - Cadang Infection



## Methods

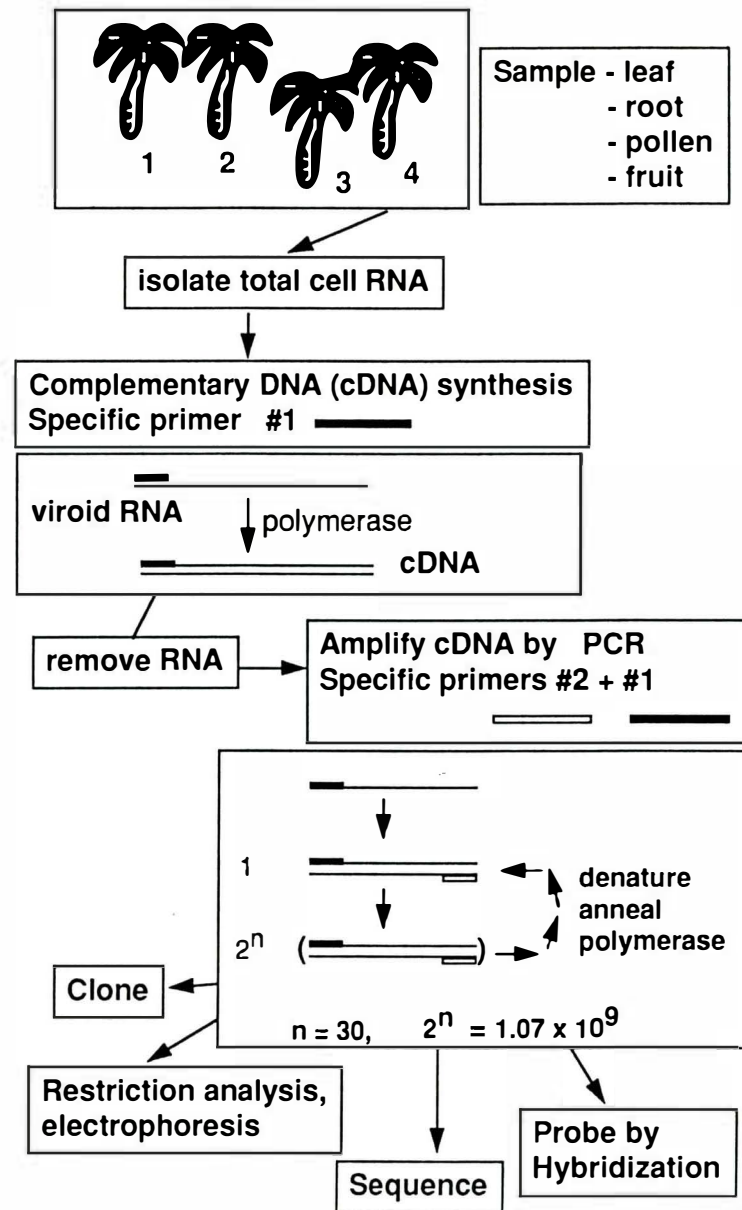
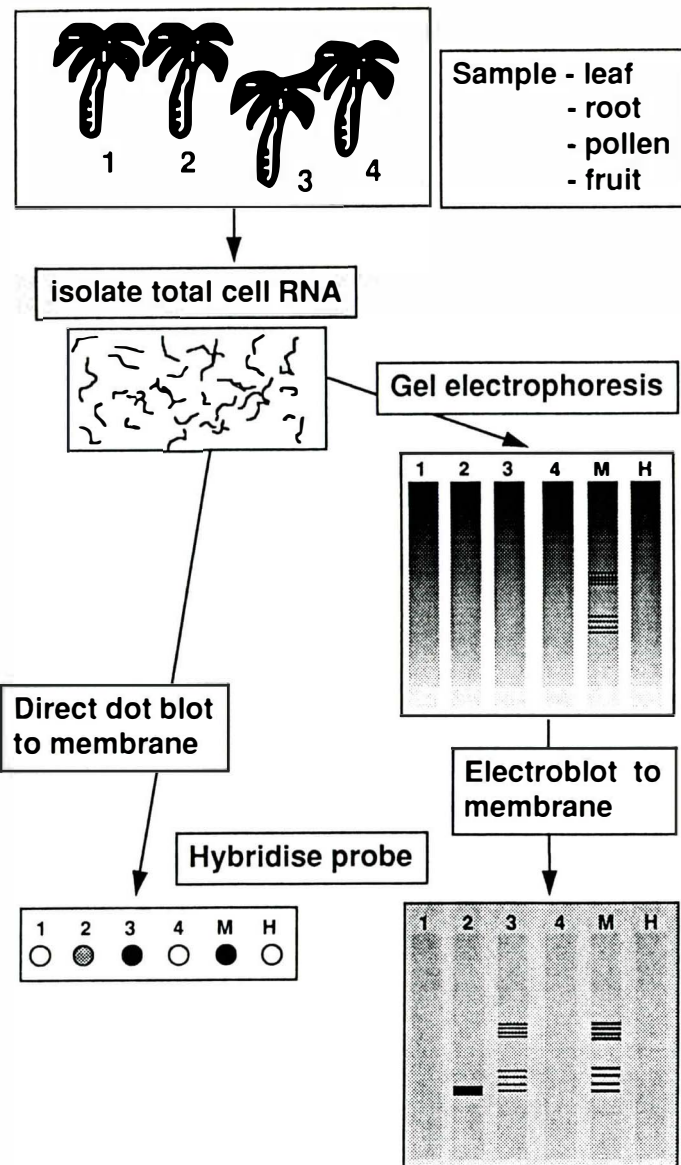
### Detection

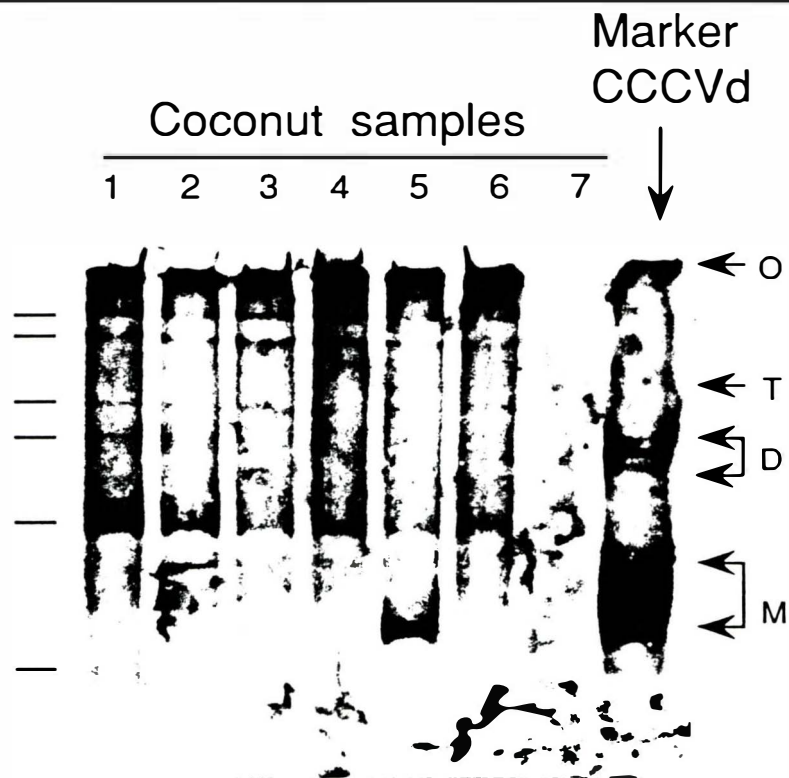
- ⇒ **Hybridisation** - of probe to membrane bound sample  
- of probe to sample in solution
- ⇒ **PCR (polymerase chain reaction)** - rapid amplification  
of small quantities of nucleic acid

### Characterisation

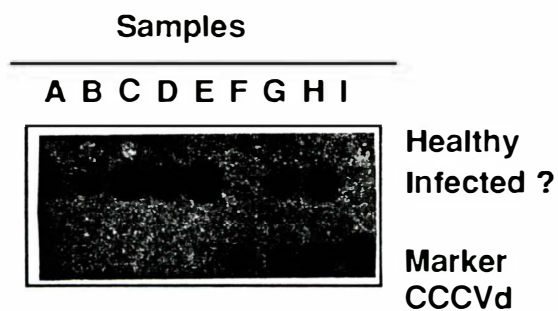
- ⇒ **Diagnostic hybridisation** - using viroid specific probes
- ⇒ **Sequencing** - direct RNA, for high abundance viroid  
- PCR product, low abundance viroid







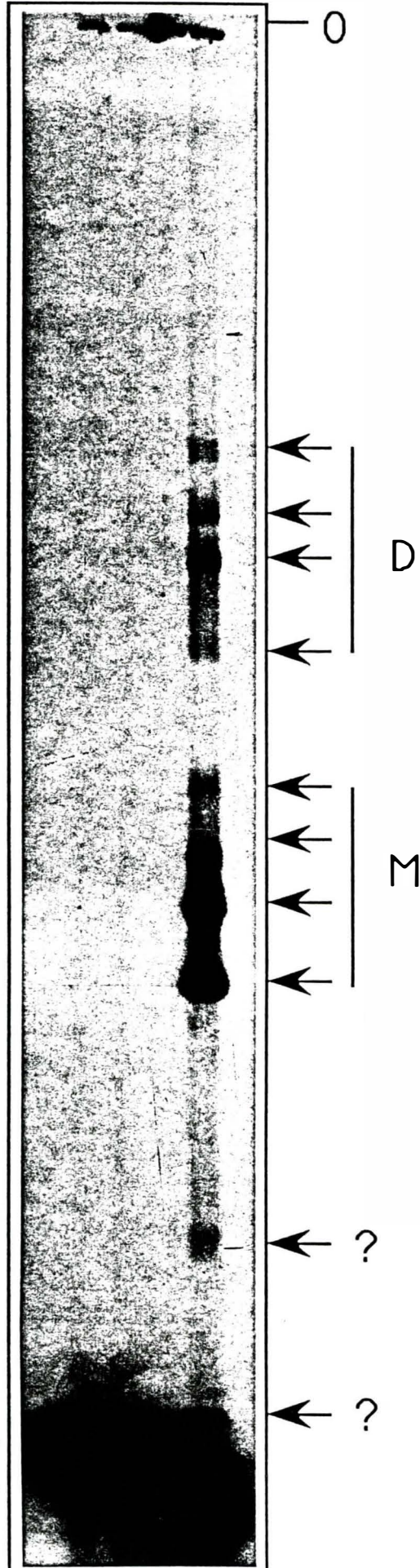
Gel separated nucleic acid was Electroblotted to membrane, then hybridised with probe

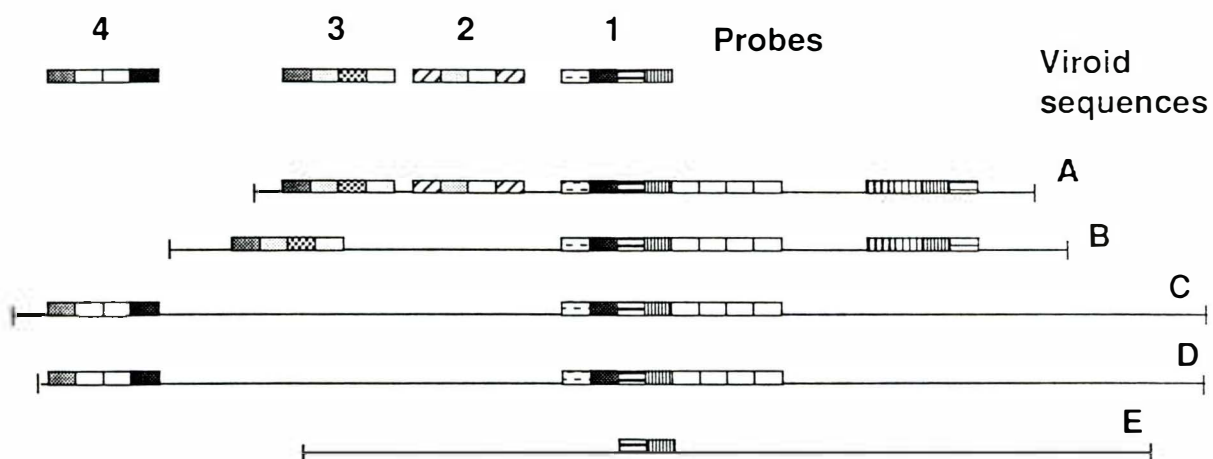


Unfractionated nucleic acid directly Dot blotted to membrane, then hybridised with probe

Probe	(-)	(-)	P	P
CCCVd	-	+	-	+

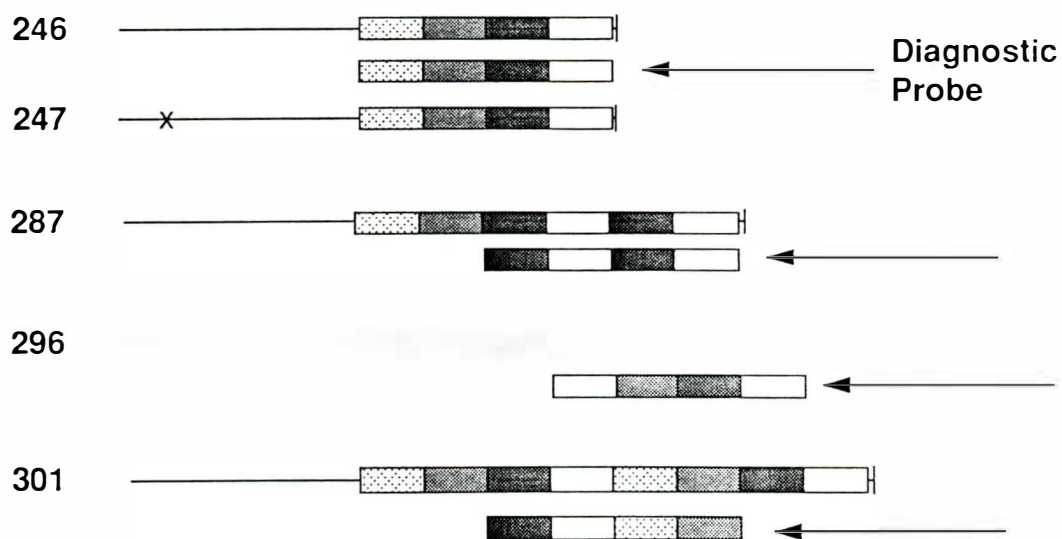
probe —  
—



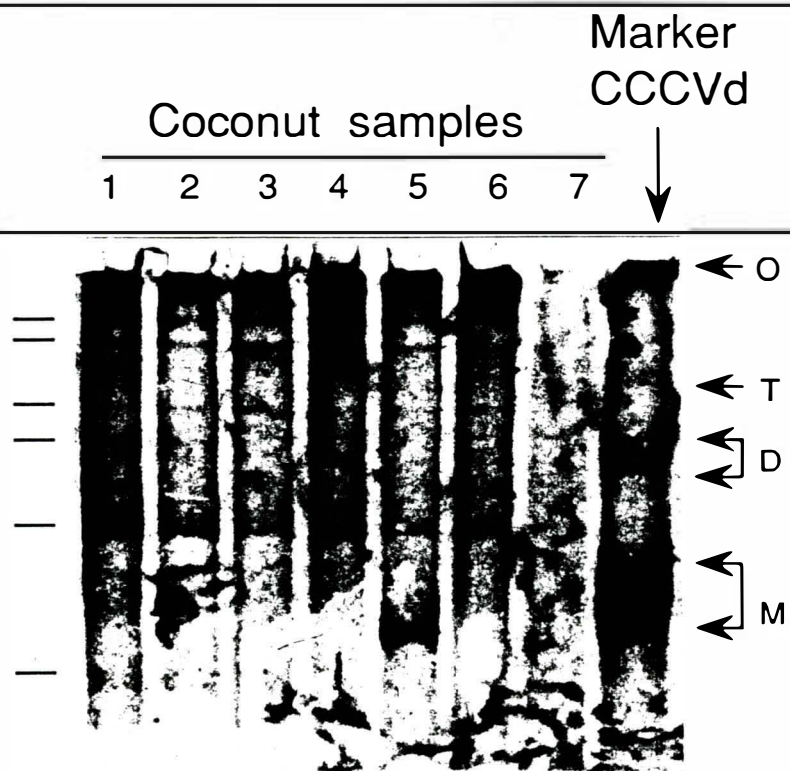


	Diagnostic Hybridization probe	1	2	3	4
A	CCCVd	Yes	Yes	Yes	
B	CCCVd close relative	Yes		Yes	
C	CCCVd distant relative 1	Yes			Yes
D	CCCVd distant relative 2	Yes			Yes
E	CCCVd unrelated				

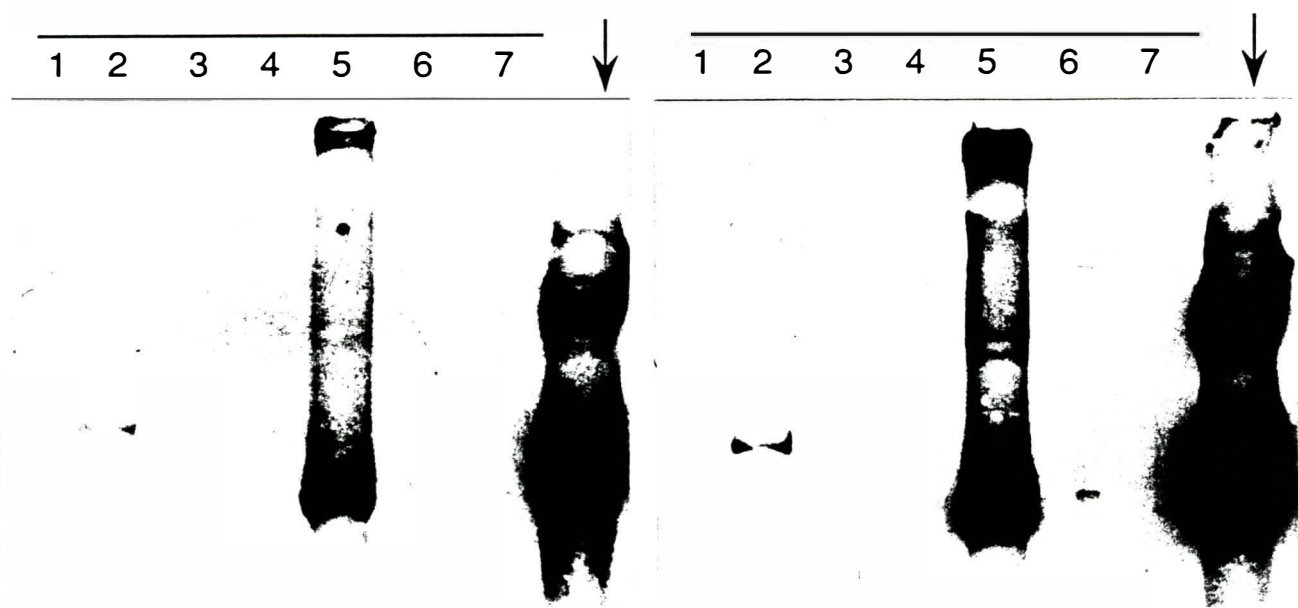
## CCCVd size variants in the Terminal 2 region





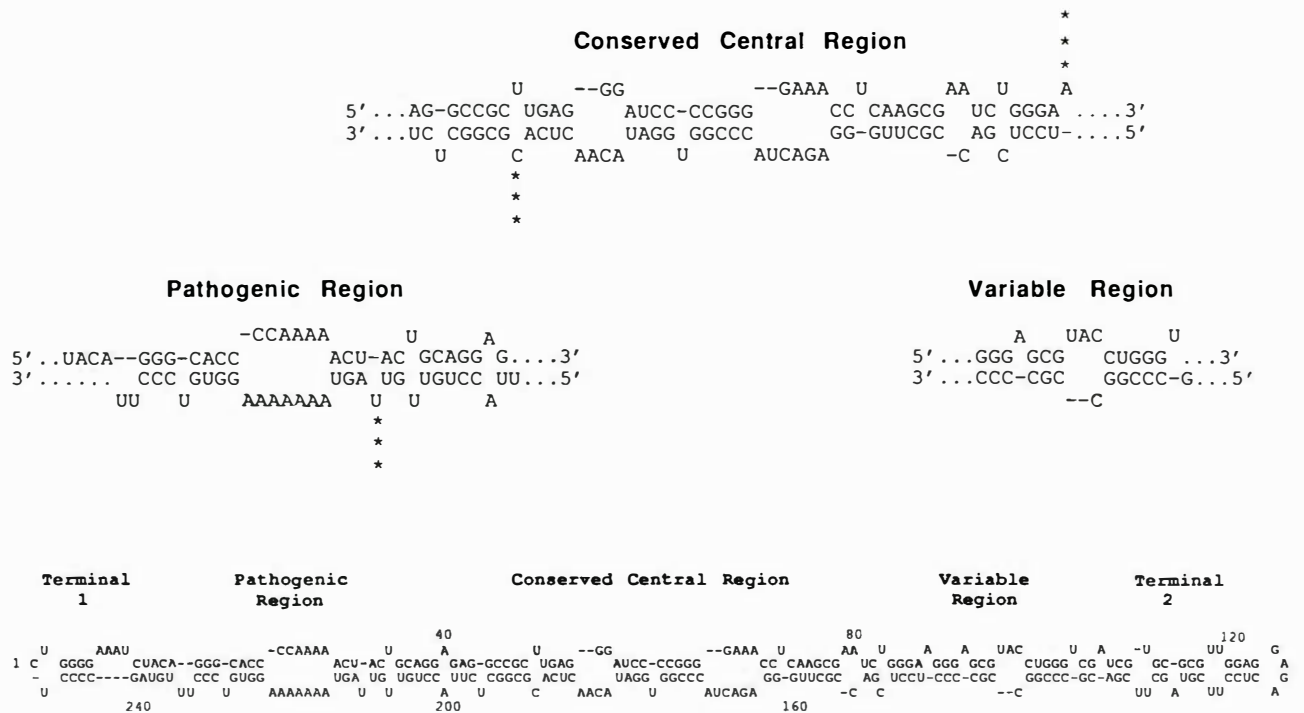


A) viroid cRNA probe



1) conserved central region probe

2) pathogenic region probe



## Future Developments

**Reduce diagnosis time** - quick viroid extraction  
- rapid viroid detection and diagnosis

**Develop diagnostic kit** - user friendly  
- portable  
- non-radioactive - chemiluminescence  
- UV fluorescence  
- colour development

**Reduce cost**

**Standardise Indexing procedure**

**Establish clean germplasm / breeding stock**

Coconut samples containing nucleic acids related to cadang-cadang viroid according to countries and sites; tested by hybridisation assay at high stringency

Country	Site	Number of samples	Positive	
			number	% of total
1	1	12	2	17
	2	63	36	57
2		38	16	42
3	1	45	32	71
	2	4	3	75
4		10	9	90
5	1	24	8	33
	2	6	5	83
	3	7	5	71
6		10	4	40
7	1	2	2	100
	2	30	13	43
8	1	24	18	75
	2	87	18	21
	3	12	6	50
	4	19	3	16
9	1	43	9	21
	2	4	1	25
	3	4	0	0
10	1	16	9	56
	2	13	9	69
11	1	55	31	56
	2	5	2	40
12	1	32	25	78
	2	19	16	84
	3	23	13	57
	4	31	18	58
13		25	13	52
14		26	11	42
15	1	15	11	73
	2	16	10	63
16	1	26	11	42
	2	21	6	29
	3	17	9	53
17		40	9	23
18		6	4	67

Country	Site	Number of samples	Positive	
			number	% of total
19		43	16	37
20		28	7	25
21		9	8	89
22		2	1	50
23		2	0	0
24		2	2	100
25		10	9	90
26		6	4	67
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>932</b>	<b>444</b>	<b>48</b>

### Explanations and Conclusions

1. The table shows the number of samples that contain nucleic acid molecules closely related to the cadang-cadang pathogen (coconut cadang-cadang viroid, CCCVd) by size and molecular structure.

Samples from different areas may contain different distinct types of these molecules, all related to CCCVd and to each other, but not identical. Further studies are needed to classify and characterise the various members of the family and to assess what risk they pose to the countries.

2. In most countries, samples of species other than coconut were also collected and analysed, including oil and other palms, Pandanus, gingers, grasses, arrowroot etc. Some of these also contained CCCVd-related molecules which need to be compared with the coconut isolates to determine whether the other species could serve as reservoirs. For oil palm, severe orange leaf spotting, reduction of yield, and stunting (previously called "genetic" orange spotting syndrome) was shown to be associated with a viroid related to CCCVd.
3. Analysis of relationships between viroid detection and origin, cultivar and age of palms is proceeding.



# OTHER SPECIES

	Other Palm Species					Pandanaaceaea					Zingiberaceae					Marantaceae					Commeliniflorae					Other Monocots				
country	total no	+ for CCCVd-probe				total no	+ for CCCVd-probe				total no	+ for CCCVd-probe				total no	+ for CCCVd-probe				total no	+ for CCCVd-probe				total no	+ for CCCVd-probe			
		overall		viroid region			overall		viroid region			overall		viroid region			overall		viroid region			overall		viroid region			overall		viroid region	
		LS	HS	LA	HS		LS	HS	LS	HS		LS	HS	LS	HS		LS	HS	LS	HS		LS	HS	LS	HS		HS	LS	HS	LS
AUS	42	20	15	9	6	16	11	8	11	6	9	7	7	3	2	3	3	3	2	2	8	8	8	6	6	17	8	7	5	4
COI	0	-	-	-	-	4	4	4	4	4	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	5	5	5	3	3
COS	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
FJ	6	3	3	2	2	24	24	23	24	21	24	11	8	5	5	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	10	9	8	5	3
FPO	5	4	4	4	4	14	14	14	13	11	11	5	2	1	1	1	1	1	1	1	7	7	4	3	2	12	10	10	7	6
GU	6	2	2	2	1	2	2	2	2	2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	4	2	2	2	0	1	1	1	1	1
IND	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
IDO	0	-	-	-	-	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	3	3	3	3	2	0	-	-	-	-	2	1	1	1	1
KIR	0	-	-	-	-	10	10	10	10	9	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
MAL	0	-	-	-	-	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	0	0	-	-	-	-	4	3	3	3	3
MAI	0	-	-	-	-	9	9	9	9	8	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	1	1	0	1	0	0	-	-	-	-
MOZ	0	-	-	-	-	1	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
NU	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	1	1	0	0	0
NC	1	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
NZ	1	1	1	1	1	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
PNG	0	-	-	-	-	2	2	2	2	2	15	14	8	11	3	2	2	2	2	1	3	3	2	3	2	0	-	-	-	-

PEL	3	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
PHIL	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	0	1	0	2	2	2	2	2	2	2	0	2	0	1	1	0	1	0
PON	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	2	2	2	2	2
SI	8	6	4	6	3	2	2	2	2	2	15	12	6	7	3	0	-	-	-	-	8	8	6	6	3	8	7	7	7	7
SRL	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
TAN	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
THA	0	-	-	-	-	1	0	0	0	0	2	2	1	1	0	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
TOG	0	-	-	-	-	6	6	6	5	4	4	3	1	1	1	0	-	-	-	-	1	1	1	1	1	6	6	5	5	3
TRU	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
TUV	0	-	-	-	-	10	10	10	10	6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
VA	11	4	4	3	3	17	15	15	15	15	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	13	6	6	5	5
WSA	0	-	-	-	-	7	7	7	7	7	10	8	8	4	3	0	-	-	-	-	2	1	0	1	0	1	1	1	1	1
YAP	1	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

# Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd) mutants associated with severe disease vary in both the pathogenicity domain and the central conserved region

M.J.B.Rodriguez and J.W.Randles<sup>1,\*</sup>

Philippine Coconut Authority, Albay Research Centre, Philippines and <sup>1</sup>Department of Crop Protection, Waite Agricultural Research Institute, University of Adelaide, Glen Osmond 5064, South Australia

Received April 19, 1993; Accepted April 28, 1993

GenBank accession no. J02049

Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd) causes a lethal disease of coconut palm in the Philippines (1). The minimal infectious viroid comprises 246 nucleotides. A single cytosine addition at position 197 to give a 247 nt molecule, and duplication of the right-hand terminus (V and T2 domains) to give molecules of 287 nts and larger are the only reported variations in the viroid structure (2, 3). Artificial passage of viroid inoculum in the Philippines has led to the appearance of a severe lamina-depleting symptom ('brooming') in about 12% of inoculated seedlings (1, 4). Electrophoretic analysis on 20% polyacrylamide gels has identified additional RNA bands with homology to CCCVd which are specifically associated with the 'brooming' (4).

Twenty-eight full length clones were obtained by reverse transcription and polymerase chain reaction (PCR) amplification of nucleic acids from palms with brooming. The PCR products were inserted in the Bluescript plasmid by the single A:T overlap method (5) and sequenced by fluorescent dye-primer cycle sequencing (Applied Biosystems Inc.). Figure 1 shows where mutations were observed in the clones. Two or more clones were obtained for each mutant. Position 197, in the lower strand of the central conserved region (CCR) (6) showed three addition and substitution mutations. A substitution was observed in the lower strand of the pathogenicity (P) (6) domain at position 216. An addition of A was also observed at the extreme right of the CCR. The clones obtained showed mutations at either one or two sites, but not at all three sites.

Therefore, CCCVd differs from the other viroids described in that mutations possibly associated with pathogenicity occur in the CCR. Other viroids of the potato spindle tuber viroid group (7, 8) show pathogenicity-associated variations in sequence outside the CCR.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr S.W.Ding and Dr N.Shirley for advice on molecular cloning and sequence analysis. M.J.B.R. was supported by the Australian International Development Assistance Bureau.

## REFERENCES

1. Hanold, D. and Randles, J.W. (1991) *Plant Disease* 75, 330-335.
2. Haseloff, J., Mohamed, N.A. and Symons, R.H. (1982) *Nature* 229, 316-321.
3. Keese, P., Visvader, J.E. and Symons, R.H. (1988) In: Domingo, E., Holland, J.J. and Ahlquist, P. (eds), *RNA Genetics, Variability of RNA Genomes*. CRC Press, Boca Raton, Vol. 111, pp. 71-98.
4. Rodriguez, M.J.B. (1993) PhD Thesis, University of Adelaide, South Australia.
5. Marchuk, D., Drummin, M., Sauline, A. and Collins, F.S. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 1154.
6. Keese, P. and Symons, R.H. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4582-4586.
7. Koltunow, A.M. and Rezaian, M.A. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 849-864.
8. Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.W., Diener, T.O. and Owens, R.A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10104-10108.

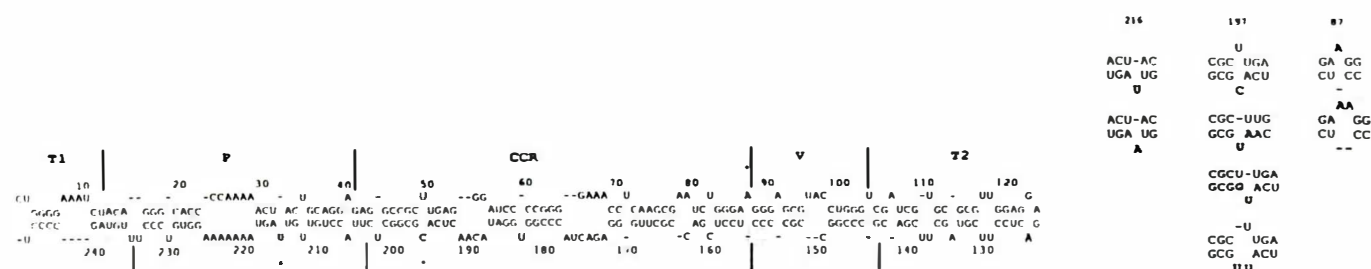


Figure 1. The minimum free energy secondary structure of CCCVd<sub>246</sub> showing the proposed T1, P, CCR, V and T2 domains (2, 3), and sites where mutations occur. The mutations at positions 87, 197 and 216 are also shown with their probable effects on secondary structure. The substituted or added nucleotides are indicated in bold letters.

\* To whom correspondence should be addressed

T1				P				CCR				V				T2			
CU	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120							
AAA	AAU	CUACA	GGG CACC	ACU AC	GCAGG GAG GCGCG	UGAG	AUCC CCGGG	CC CAAGCG	UC GGA GGG GCG	CUGGG CG UCG	GC GCG	GGAG A							
CCCC	GAUGU	CCC GUGG	UGA UG	UGUCC	UUC CCGCG	ACUC	UAGG GGCCC	GG GUUCGC	AG UCCU	CCC CGC	GGCCC GC AGC	CG UGC	CCUC G						
-U	----	UU	U	AAAAAA	U	A	U	C	AACA	U	AUCAGA	-	-C	C	-	-			
	240	230	220	210	200	190	180	170	160	150	140	130							

216

197

87

ACU-AC  
UGA UG  
U

U  
CGC UGA  
GCG ACU  
C

A  
GA GG  
CU CC  
-

ACU-AC  
UGA UG  
A

CGC-UUG  
GCG AAC  
U

AA  
GA GG  
CU CC  
--

CGCU-UGA  
GCGG ACU  
U

-U  
CGC UGA  
GCG ACU  
UU



## Communique from the ACIAR-sponsored meeting at Taveuni, Fiji, on the implications of *viroid-like RNAs* for the movement of coconut germplasm in the South Pacific region.

This draft statement was prepared by the 22 delegates to the meeting in order assist government bodies and other agencies with responsibility for advice or policy relating to the movement of coconut germplasm.

Taveuni 13/11/93.

1. Sufficient research results with respect to **viroid-like RNAs** are not yet available for a definite policy on movement of germplasm to be established.

2. Pending clarification of the problem of **viroid-like RNAs** as recommended below, it is strongly suggested that SPC does not recommend the movement of coconut germplasm between countries unless testing has shown the material to be free of **viroid-like RNAs**. In other respects IBPGR guidelines should be followed as far as they are applicable to the South Pacific region.

3. Given the urgency of the need to facilitate germplasm exchange, funding must be found for the following priority activities:

(a) to establish an indexing facility for **viroid-like RNAs**;

(b) sequencing of the **viroid-like RNAs** found in coconut in order to characterise their unknown aspects, especially the degree of relatedness of those found in coconuts from different countries;

(c) to initiate research on **viroid-like RNAs** to determine whether they are in fact pathogenic or not pathogenic to a range of coconut populations.

4. More support is required to create, through training and collaboration, and general awareness of the problem of the **viroid-like RNAs**.